

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### 新生糖タンパク質の品質管理を担うマレクチンの生化学的解析

(Functional analysis of malectin in the quality control of nascent glycoprotein)

氏名 武田 晃

#### 【序論】

タンパク質合成の場である小胞体では、膨大な数の新生タンパク質について、折りたたみ不完全なタンパク質のフォールディング、ミスフォールドタンパク質の分解、正しくフォールドされたタンパク質を輸送・選別することで品質管理している。この機構は各々の新生タンパク質に付加されるN型糖鎖と、その糖鎖構造を認識するわずか10種類程度の細胞内レクチンによつて的確に行われている。

Oligosaccharyltransferase (OST)によって新生ポリペプチド鎖のAsnに付加された14糖からなるGlc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>(G3M9)糖鎖は、糖タンパク質のフォールディング状態に応じてGlucosidasesまたはMannosidaseにより糖が刈り取られ、各々の糖鎖構造が品質管理における「タグ」の役割を果たす(図1)。これら一連の糖鎖構造を認識するレクチンおよびその機能は、長年に渡る研究から多くが明らかにされてきている。近年、G2M9糖鎖を認識するレクチンとして*Xenopus laevis*から「マレクチン」が同定された。マレクチンのアミノ酸配列は動物間で高度に保存されていることから、細胞内で重要な役割を果たしていると考えられた。

これまでマレクチンの機能に関して当研究室の研究から以下のことが明らかになった。モデル糖タンパク質であるα1-アンチトリプシン(AT)およびそのミスフォールド体α1-AT NullHong Kong(AT<sup>NHK</sup>)を用いた研究から、ヒトのマレクチンは正常な構造の新生タンパク質よりもミスフォールドな構造の新生タンパク質に優先的に結合し、細胞外への分泌を抑制すること。また、Ribophorin1というタンパク質がマレクチン

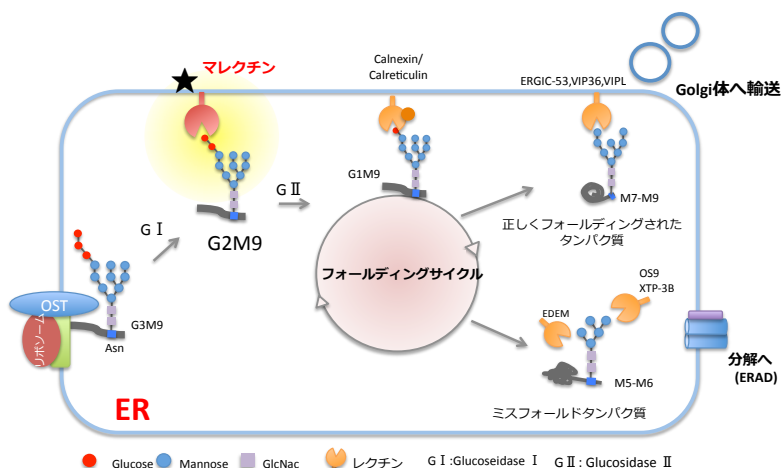


図1 タンパク質の小胞体品質管理機構とレクチン

ンと相互作用して上記の機能に関与する可能性を示した。本研究ではこれらの研究をふまえ、多角的な面からマレクチンを解析し、その機能をより深く理解することを目的とした。

## 【結果と考察】

### 1. マレクチンは Oligosaccharyltransferase (OST) complex の構成分子である

当研究室の卒業生の秦氏は、質量分析を用いてマレクチン相互作用分子の網羅的解析を行い、相互作用する分子として OST complex の構成分子の 1 つである Ribophorin1 を同定した。OST は N 型糖鎖を付加するサブユニットである。私は、マレクチンが OST コンポーネントであると仮定し、いくつかの改良を施した上で、改めて質量分析で網羅的解析を行った。作製した HEK293-マレクチン安定発現細胞由来の免疫沈降産物を SDS-PAGE し、前処理を経て質量分析したところ、Ribophorin1 の他に OST のコンポーネントである Ribophorin2, OST48 がマレクチンの相互作用分子として同定された。また、免疫沈降産物を Nano-LC で分離した後、質量分析する方法で解析したところ、OST の活性中心である Stt3A も同定された。以上の結果から、マレクチンは OST complex の一部としてこれらの分子と相互作用していると考えた。

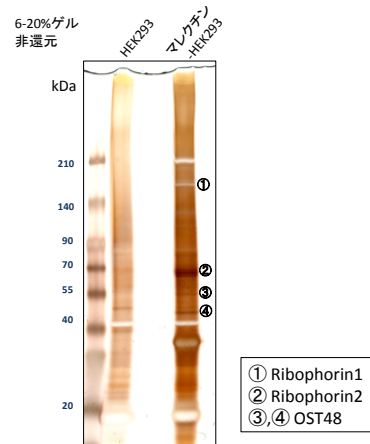


図2 マレクチン-免疫沈降後の SDS-PAGE

### 2. OST complex と結合不能なマレクチン変異体を使った解析

マレクチンが OST コンポーネントとしてミスフォールドタンパク質の分泌抑制の機能に関わっているのか確かめるため、OST complex に結合不能でかつ小胞体に局在するようなマレクチン変異体を作製し、解析を試みた。

#### 2-1) OST complex と結合不能なマレクチン変異体の作製

Ribophorin1 とマレクチンの相互作用する部位を調べるため、マレクチンの様々な部位欠損変異体を作製し、両者の結合を確かめた。その結果、マレクチンと Ribophorin1 は膜貫通領域で結合することが示唆された。そこで、N 末端に FLAG タグを付加し膜貫通領域を欠損させた変異体 Mal-ΔTM に小胞体滞留シグナル KDEL を C 末端に付加した Mal-ΔTM-KDEL のコンストラクトを作製した (図 3)。Mal-ΔTM-KDEL と OST コンポーネントである Ribophorin1、Ribophorin2 および OST48 との結合を共免疫沈降で調べたところ、どちらの分子とも相互作用しないことが分かった (図 4)。また、変異体の細胞内局在を蛍光免疫染色で調べたところ、マレクチン (Mal) および小胞体滞留シグナルを付加した Mal-ΔTM-KDEL は小胞体に局在することが分かった。このことから、Mal-ΔTM-KDEL は小胞体局在し、かつ OST complex に結合不能な変異体であると判断した。

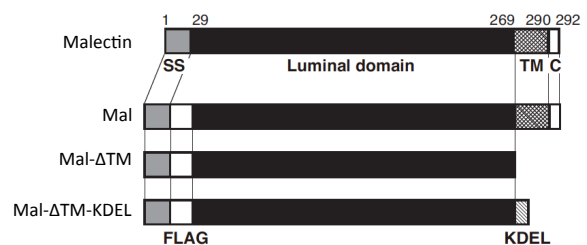


図3 OST complex と結合不能な変異体

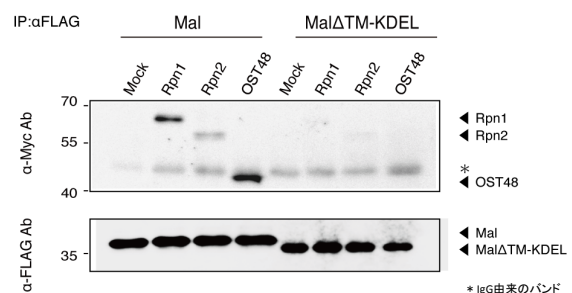


図4 Mal-ΔTM-KDEL 変異体は OST complex と相互作用しない

#### 2-2) Mal-ΔTM-KDEL は小胞体で AT<sup>NHK</sup> と結合する

共免疫沈降による解析から Mal- $\Delta$ TM-KDEL はミスフォールドモデル糖タンパク質 AT<sup>NHK</sup>と結合することが分かった。さらにこの免疫沈降産物を Endoglycosidase H(Endo-H)処理したところ、Mal- $\Delta$ TM-KDELと結合したAT<sup>NHK</sup>の糖鎖は全て切断された。Endo-Hはハイマンノース型糖鎖を切断することから、Mal- $\Delta$ TM-KDELはMalと同様に、小胞体でAT<sup>NHK</sup>と結合することが分かった。

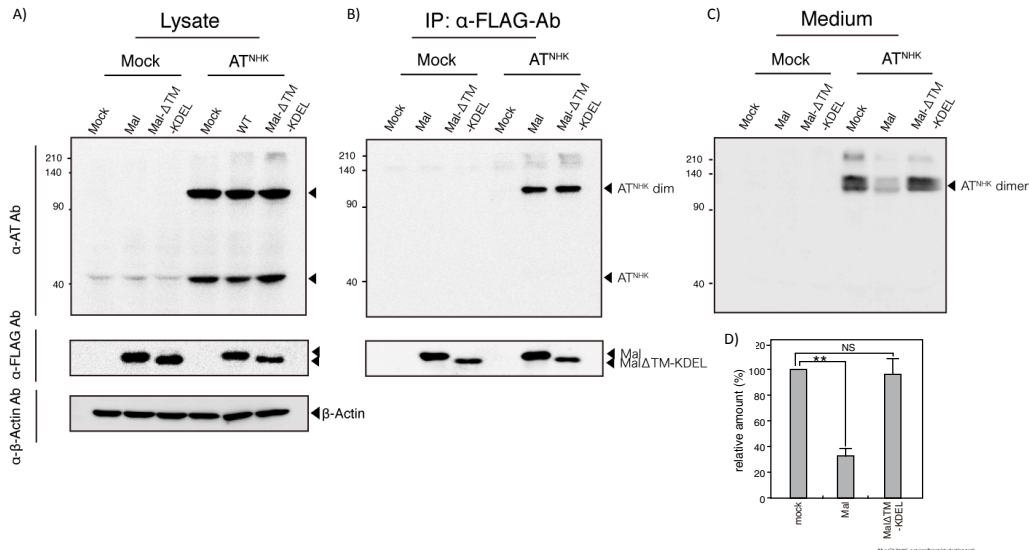


図5 Mal $\Delta$ TM-KDEL変異体はAT<sup>NHK</sup>の分泌を抑制しない

AT<sup>NHK</sup>およびMal、またはMal $\Delta$ TM-KDELを一過性でHela細胞に共発現させ、24hr後に培養液を交換した後、48hr後に培養液および細胞を回収した。細胞はLysisした後、 $\alpha$ -FLAG抗体で免疫沈降し、 $\alpha$ -AT抗体でウエスタンブロットした(B)。細胞外へ分泌されたAT<sup>NHK</sup>はメディウムを $\alpha$ -AT抗体でウエスタンブロットし解析した(C)。(C)のAT<sup>NHK</sup>のバンドの濃度をdensitometry解析で比較した(D)。 $\alpha$ -AT抗体で解析した結果は非還元、 $\alpha$ -FLAG抗体および $\alpha$ -bActin抗体の結果は還元条件で行った。

**2-3) OST complexと結合不能なMal- $\Delta$ TM-KDEL変異体はAT<sup>NHK</sup>の分泌を抑制しない**  
 Mal- $\Delta$ TM-KDELがAT<sup>NHK</sup>の分泌抑制に関わるか解析した。HeLa細胞にAT<sup>NHK</sup>とMalまたはMal- $\Delta$ TM-KDELを共発現させた後、細胞外に分泌されたAT<sup>NHK</sup>量、およびマレクチンと結合したAT<sup>NHK</sup>量を共免疫沈降とウエスタンブロットで確かめた。その結果、MalはAT<sup>NHK</sup>の細胞外への分泌を抑制したが、Mal- $\Delta$ TM-KDELは分泌を抑制しないことが分かった(図5-C,D)。このことから、マレクチンがOST complexと結合不能な場合、AT<sup>NHK</sup>の分泌抑制はしないことが分かった。したがって、分泌抑制にはマレクチンとOST complexとの結合が必要であることが示唆された。

### 3 Protein-fragment Complementation Assay を利用したマレクチン相互作用分子の解析

免疫沈降のような *in vitro* のスクリーニング系は、細胞を可溶化してしまうことや wash 等の操作により弱い相互作用を検出すること困難などの問題点が挙げられる。そこで、「細胞内でのスクリーニング系」を用いてマレクチンと相互作用する分子を明らかにすることで、新たな知見が得られるのではないかと考えた。本研究では蛍光タンパク質を利用した、Protein-fragment complementation assay (PCA)を用いてマレクチンの相互作用分子を探索するに至った。

#### 3-1) PCAによるマレクチン相互作用分子のスクリーニング

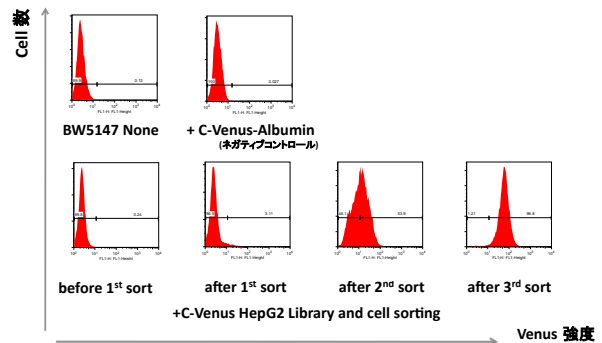


図6 PCAを利用したマレクチン相互作用分子の探索

N-Venus-マレクチン発現細胞に、HepG2-C-Venus-ライブラリーを安定発現させ、セルソーターを用いて蛍光陽性細胞集団を濃縮した。ソーティング前後の細胞群をフローサイトメトリーで解析した。

PCAは細胞内で2つのタンパク質の相互作用を解析できる方法である。蛍光タンパク質のN末端断片をタンパク質Aに、C末端断片をタンパク質Bに融合した形で細胞内に発現させ、AとBのタンパク質間結合を蛍光タンパク質断片の近接による蛍光発光として検出する系である。今回、当研究室の卒業生の北條氏の研究に基づきマレクチン相互作用分子のPCAスクリーニングを行った。bait(えさ)として、蛍光タンパク質VenusのN末端側のフラグメントを融合したN-Venusマレクチンを細胞に発現させた後、同細胞にprey(獲物)としてVenusのC末端側のフラグメントを融合したC-Venus-HepG2 cDNA Libraryをウイルス感染させ、安定発現条件下でPCAを行った。ライブラリーは平均インサート長1050 bpで $3.1 \times 10^6$ の独立クローンからなる。蛍光強度が上位5%の細胞集団をセルソーターで3回濃縮操作を行ったところ、濃縮前と比較してVenusの蛍光陽性率が98%の細胞集団を得た(図6)。得られた細胞集団から限界希釈でクローン化し、フローサイトメトリーにおける測定でコントロールに比べ有意に蛍光を発した100クローンから20クローンを選択した。total RNAから各クローンにコードされているC-Venusライブラリー由来の遺伝子を調べたところ、1クローンにつき1~5種類のC-Venus由来の遺伝子が導入されていたことが分かった。各々についてシーケンス解析し、スタートコドンの有無およびコドンフレームからC-Venusタンパク質発現に関与する遺伝子を明らかにした。

### 3-2) PCAスクリーニングの結果と検討

調べた20クローンから11種類の遺伝子がマレクチンの相互作用分子の候補に挙げられた(表1)。これらの候補分子について、発現量をそろえて蛍光強度を解析するため、一過性条件でHeLa細胞に発現させてPCAを行い、フローサ

表1 PCAスクリーニングによるマレクチン相互作用候補分子

No	Name	部分配列の長さ AA	全長 AA	glycosylation site	Function or interaction	localization	コードされていたクローン数
1	FK506BP	57	142	None	Chaperon	ER	3
2	PDIA6	144	440	None	Chaperon	ER	1
3	ERP29	180	266	None	Chaperon	ER	1
4	Calreticulin	375	417	1	Chaperon	ER	2
5	CathepsinZ	226	303	2	Glycoprotein	Lysosome	1
6	Transferrin	330	698	3	Glycoprotein	plasma	2
7	Granulin	273	593	5	Glycoprotein	Secreted	1
8	Mac2-BP	405	585	7	Glycoprotein	Secreted	2
9	Preapoliipoprotein E (APOE)	309	317	7	Glycoprotein	Secreted	1
10	TAP BP variant2 (tapasin)	293	448	1		Golgi or ER	1
11	Integral membrane protein G2	160	267	1		Golgi	1

イトメトリーで蛍光を測定し蛍光陽性細胞率を比較した。その結果、ネガティブコントロールであるAlbuminと比較し、有意に蛍光陽性を示した。さらに、小胞体で機能する分子シャペロンPDIA6、ERP29、Calreticulin、および基質として結合すると考えられる糖タンパク質Mac2BP、Transferrinについて、全長配列をコードしたC-Venusコンストラクトを作製しN-Venus-マレクチンとPCAを行ったところ、いずれの分子もコントロールに比べ有意に蛍光を示しマレクチンと相互作用することが分かった。さらに、分子シャペロンPDIA6、ERP29、Calreticulinは架橋剤を用いた共免疫沈降法からもマレクチンと相互作用することが見出された。したがって、マレクチンは分子シャペロンと相互作用し基質タンパク質のフォールディング促進に関与することが予想された。

### 【結論】

マレクチン安定発現細胞を使った免疫沈降および質量分析の解析から、マレクチンがOSTのコンポーネントであることを見出した。また、OST complexに結合不能でかつ小胞体に局在するマレクチン変異体を用いた解析から、マレクチンがOSTのコンポーネントとしてミスフォールドタンパク質の分泌抑制に関与することが示唆された。一方、マレクチンと相互作用する分子を細胞内でスクリーニングすることで、免疫沈降法によるスクリーニングからは明らかにならなかった糖タンパク質、および分子シャペロンが同定された。新生タンパク質に付加されたG3M9糖鎖は、酵素によりG1M9糖鎖へとトリミングされる過程でG2M9糖鎖を経る。マレクチンは新生糖タンパク質のG2M9糖鎖をトラップすることで、マレクチンと直接あるいは間接的に結合した分子シャペロンのフォールディングを助ける、フォールディングに失敗し、タンパク質表面に疎水面を多く露出したようなミスフォールドなものは分泌経路へのリクルート抑制に関与すると考えられる。